

10/070387

PCT/JP 00/06103

JP 00/6103 日本国特許庁

07.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月 7日

REC'D 27 OCT 2000

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第253040号

出願人
Applicant(s):

明治製菓株式会社

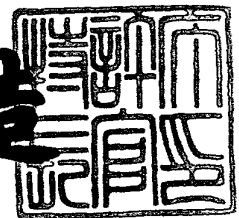
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083130

【書類名】 特許願

【整理番号】 PM1533

【提出日】 平成11年 9月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 御堂 直樹

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 岡倉 薫

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 宮本 功一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 渡辺 学

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 矢内 耕二

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

 【氏名】 安武 哲也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 相原 智

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 二村 孝文

【発明者】

【住所又は居所】 ドイツ連邦共和国ベルリン 1 0 5 8 7, フランクリン・
シュトラセ 2 9, マックス・フォルマー・インスティ
テュット・フュア・ビオフィジカリッシェ・ケミー・ウ
ント・ビオケミー, テヒニッシェ・ユニバルジテート・
ベルリン

【氏名】 ホルスト・クラインカウフ

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品
技術研究所内

【氏名】 村上 健

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【代表者】 北里 一郎

【電話番号】 03-3273-3357

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】	要約書	1
【物件名】	図面	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 環状デブシペプチド合成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 又は (b) の DNA を有する遺伝子。

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA。

(b) (a) の塩基配列を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ環状デブシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする微生物由来の DNA。

【請求項 2】

以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ環状デブシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の組換えベクターを含み、かつ該遺伝子を発現している微生物。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の微生物が PF1022 物質生産菌である微生物。

【請求項 6】

請求項 4 又は請求項 5 に記載の微生物を用いて PF1022 物質又はその誘導体を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、駆虫活性を有する環状デブシペプチドである PF1022 物質を製造する

ための環状デブシペプチド合成酵素遺伝子、該遺伝子のコードするタンパク質、該遺伝子を用いた組換えベクター、及びこの組換えベクターを導入したPF1022物質生産菌におけるPF1022物質を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

PF1022物質 [シクロ (D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル-D-ラクチル-L-N-メチルロイシル-D-3-フェニルラクチル-L-N-メチルロイシル)] は、アゴノマイセタレス (Agonomycetales) に属する糸状菌、PF1022株 (Mycelia sterilia、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2671として寄託されている。) により生産される環状デブシペプチドであり、動物寄生性の線虫類に対して極めて高い駆虫活性を示す [特開平3-35796号、Sasaki, T. et al. J. Antibiotics., 45, 692, (1992)]。そのため、本物質は動物用の駆虫薬として有用であると共に、さらに高活性な本物質の誘導体を合成するための原料として有用である。

【0003】

一般に、天然から分離された微生物の生産する二次代謝産物の量は、微量である。そのため、これを産業的に利用するためには、二次代謝産物の生産量を向上させる必要がある。生産量を向上させるためには、培養方法の検討、培地成分の検討、及び前駆体の添加といった発酵条件の改良、並びに紫外線照射又は突然変異誘発剤による突然変異を利用した菌株の改良が行われる。最近では、これらの方法に加えて遺伝子組換えの手法を利用した生産性の向上も行われるようになってきた。

【0004】

その方法としては、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強、生合成の制御遺伝子の発現増強、不必要な生合成経路の遮断、等が行われている [Khetan, A. and Hu, W.-S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd edition, p. 717, (1999)]。また、特殊な例としては、酸素利用能の向上を目的として、細菌のヘモグロビン遺伝子を発現させ、生産性を向上させる方法も知られている [Minas, W. et al. Biotechnol. Prog., 14, 561, (1998)]。

【0005】

遺伝子組換えの手法を用いて生産性の向上を図る際に、最も一般的な手法は、生合成経路の酵素遺伝子の発現増強である。この手法を適応するためには、対象とする微生物において形質転換の方法が確立していること、発現増強のために利用可能なプロモーター及びターミネーターが存在すること、また生合成経路が明らかとなっており、それらの遺伝子が単離されていることが必要である。PF1022物質生産菌においては、既に外来遺伝子を導入する形質転換の方法が確立しており（W097/00944号）、さらに発現増強のために利用可能なプロモーター及びターミネーターに関する報告もなされている（特願平11-252851号）。しかし、生合成経路の遺伝子は単離されていなかった。

【0006】

PF1022物質は、L-N-メチルロイシン、D-乳酸、及びD-フェニル乳酸がエステル結合及びアミド結合を介して結合した構造からなり、生産菌中では4分子のL-ロイシン、2分子のD-乳酸、2分子のD-フェニル乳酸から、ある種のペプチド合成酵素により合成されと考えられる。ペプチド合成酵素とは、アミノ酸やヒドロキシ酸を基質として、ペプチド、デプシペプチド、リポペプチド、ペプチドラクトン等の微生物の二次代謝産物の生合成を行う酵素であり、既に幾つかのペプチド合成酵素の配列が明らかとなっている [Marahiel, M.A. et al. Chem. Rev., 97, 2651, (1997)]。この酵素による反応は、mRNAを鋳型としたリボソームによるタンパク質の合成系とは全く異なっている。ペプチド合成酵素は、各基質に対して1つのドメインを持ち、各基質はこのドメインでATPにより活性化され、ドメイン中のホスホパントテン酸を介して結合し、これらが各ドメイン間の領域の触媒作用によりアミド結合やエステル結合を形成すると考えられている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

PF1022物質生産菌において、過剰発現させることにより、PF1022物質の生産性を向上させ得る環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を提供する。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、既知のペプチド合成酵素の保存領域の配列を元に、PF1022物質生産菌から、PF1022物質を合成するための環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を単離した。さらに、この遺伝子のプロモーター、及びターミネーターを変換した発現ベクターを作製し、これをPF1022物質生産菌に導入することによりPF1022物質の生産性を向上させることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、

(1) 以下の (a) 又は (b) のDNAを有する遺伝子、

(a) 配列番号 1 に示す塩基配列を有するDNA、

(b) (a) の塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ環状デブシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質をコードする微生物由来のDNA、

(2) 以下の (a) 又は (b) のタンパク質、

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ環状デブシペプチド合成酵素活性を有するタンパク質、

(3) (1) に記載の遺伝子を含有する組換えベクター、

(4) (3) に記載の組換えベクターを含み、かつ該遺伝子を発現している微生物、

(5) (4) に記載の微生物がPF1022物質生産菌である微生物、

(6) (4) 又は (5) に記載の微生物を用いてPF1022物質又はその誘導体を製造する方法に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子は、例えば以下の方法によりPF1022物質生産菌から単離することができる。

【0011】

PF1022物質生産菌からゲノムDNAを抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクターを用いて、PF1022物質生産菌のゲノムDNAからなるライブラリーを作製する。

既知のペプチド合成酵素のアミノ酸配列の保存領域、又はPF1022物質生産菌から精製した環状ペプチド合成酵素の部分アミノ酸配列を元に、適当なプライマーを合成し、それを用いてPF1022物質生産菌由来のゲノムDNAを鋳型としたpolymerase chain reaction (PCR) を行い、環状ペプチド合成酵素遺伝子のDNA断片を増幅する。このDNA断片をプローブとして用い、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行う。このようにして、環状ペプチド合成酵素遺伝子の全域を単離することができる。このDNA断片の塩基配列を決定した後、翻訳開始コドンの上流及び翻訳終始コドンの下流に、PCR等の手法により適当な制限酵素切断部位を導入し、環状ペプチド合成酵素遺伝子のみを含む遺伝子断片を得ることができる。

【0012】

本発明の遺伝子は上述のようにして決定された塩基配列に対してストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列をも包含する。また、遺伝子工学の慣行法（例えば部位指定変異等）を用いて本遺伝子に、付加、挿入、欠失又は置換等の改変を行ったDNA断片も本発明に包含される。ここでいうストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄操作を、高温の低塩濃度溶液中で行うことを示し、例えば、 $0.2\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$: 15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム) - 0.1% SDS溶液中で60℃、15分間洗浄するといった条件である。

【0013】

上記の方法で単離した環状ペプチド合成酵素遺伝子は、上流にプロモーターを、また下流にターミネーターを連結し、さらに栄養要求性相補又は／及び薬剤耐性等の選択マーカー遺伝子を連結して遺伝子発現用の組換えベクターを作製することができる。

【0014】

遺伝子発現用の組換えベクターに用いる選択マーカーとしては、pyrG、argB、trpC、niaD、TRP1、LEU2、URA3等の栄養要求性相補遺伝子、デストマイシン、ベ

ノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、G418、ブレオマイシン、フレオマイシン、フォスフィノスリシン、アンピシリン、カナマイシン等に対する薬剤耐性遺伝子等が挙げられる。

【0015】

本発明の遺伝子へのプロモーター及びターミネーターの連結、ベクターへの挿入は、それ自体公知の方法で行うことができる。本発明に用いるプロモーター及びターミネーターは特に限定されず、例えば3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、エノラーゼ等の解糖系酵素遺伝子、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ、トリプトファンシンターゼ等のアミノ酸合成系酵素遺伝子、アミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、アセトアミダーゼ等の加水分解酵素遺伝子、ナイトレイトレダクターゼ、オロチジン-5'-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等の酸化還元酵素遺伝子、さらにはAbp1等のPF1022物質生産菌中で高発現するPF1022物質生産菌自体の遺伝子等が挙げられる。

【0016】

このようにして得られた組換えベクターにより、宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、PF1022物質を著量生産させることができる。また、本発明の環状デプシペプチド合成酵素の基質であるL-ロイシン、D-乳酸、又はD-フェニル乳酸を合成しない宿主においては、不足する基質又は基質の誘導体を添加して培養することにより、PF1022物質又はPF1022物質の誘導体を生産させることが可能である。本発明は、前記形質転換体を培地にて培養し、得られた菌体からPF1022物質又はPF1022物質の誘導体を採取することをも含む。

【0017】

使用される宿主としては、遺伝子組換えの宿主として使用可能な任意の細菌類又は真菌類の微生物を用いることができ、特に限定されるものではないが、好ましくは大腸菌、バチルス属細菌、放線菌、酵母、糸状菌であり、より好ましくはPF1022物質生産菌である糸状菌、特に好ましくはPF1022株 (Mycelia sterilia, FERM BP-2671) である。

【0018】

宿主の形質転換もそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、宿主への遺伝子発現用の組換えベクターの導入は、常法に従って行うことができ、例えばエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、リチウム法、塩化カルシウム法等が用いられ、特に限定されるものではない。

【0019】

また、形質転換体の培養も常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュクロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、ファーマメディア、コーン・ステープ・リカー、綿実粕、肉エキス、ポリペプトン、マルトエキス、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム（炭酸カルシウム等）、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸（リン酸水素2カリウム等）、硫酸（硫酸マグネシウム等）及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類を添加することも有効である。また、必要に応じてチアミン（チアミン塩酸塩等）等の各種ビタミン、グルタミン酸（グルタミン酸ナトリウム等）、アスパラギン（DL-アスパラギン等）等のアミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、PF1022物質又はPF1022物質の誘導体の生産を促進するような有機物及び無機物を適当に添加することができる。

【0020】

培地のpHは、例えばpH6～pH8程度である。培養法としては、好気的条件下の振とう培養法、通気攪拌培養法又は深部好気培養法により行うことができるが、特に深部好気培養法が最も適している。培養に適当な温度は、15℃～40℃であるが、多くの場合26℃～37℃付近で生育する。PF1022物質又はPF1022物質の誘導体の生産は、培地及び培養条件、又は使用した宿主により異なるが、いずれの培養法においても通常2日～25日間でその蓄積が最高に達する。培養中のPF1022物質又はPF1022物質の誘導体の量が最高になった時に培養を停止し、培養物から目的物質を単離、精製する。

【0021】

培養物からPF1022物質又はPF1022物質の誘導体を採取するためには、その性状を利用した通常分離手段、例えば溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着又は分配カラムクロマトグラフィー法、ゲル濾過法、透析法、沈殿法、結晶化法等を単独で、又は適宜組み合わせで抽出精製することができる。例えば、培養物中からはアセトン、メタノール、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等で抽出される。PF1022物質又はPF1022物質の誘導体をさらに精製するには、シリカゲル、アルミナ等の吸着剤、セファデックス LH-20（ファルマシア社）又はトヨパールHW-40（東ソー社）等を用いるクロマトグラフィーを行うと良い。以上のような方法により、又はこれらを適宜組み合わせることにより、純粋なPF1022物質又はPF1022物質の誘導体を得られる。

【0022】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0023】

実施例1 PF1022物質生産菌からの環状デプシペプチド合成酵素遺伝子のクローニング

1. ゲノムDNAの単離とゲノムライブラリーの作製

ゲノムDNAは、PF1022物質生産菌 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) に対してUV照射又はNTG処理により突然変異を誘発し、PF1022の生産性を向上させたPF1022物質生産菌432-26株から抽出した。PF1022物質生産菌432-26株を50 mlの種培地 [1%イーストエキス、1%マルトエキス、2%ポリペプトン、2.5%グルコース、0.1%リン酸水素2カリウム、0.05%硫酸マグネシウム (pH 7.0)] で26℃にて2日間培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体を液体窒素で凍結後、乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。この磨砕した菌体からISOPLANT（ニッポンジーン社）により、添付のプロトコールに従いゲノムDNAを単離した。単離したゲノムDNAをSau3A Iにより部分分解した後、アガロースゲル電気泳動により15 kb～20 kbのDNA断片を回収し、これをアルカリフォスファターゼで処理し、DNA断

片の末端を脱リン酸化した。このDNA断片をファージベクターのLambda DASH II (ストラタジーン社) に挿入した。このようにして得られた組換えファージベクターについて、GigapackIII Gold Packaging Extract (ストラタジーン社) により、添付のプロトコールに従って *in vitro* パッケージングを行った。その後、この組換えファージを大腸菌XL1-Blue MRA (P2) 株に感染させ、プレートにて培養しプラークを形成させた。

【0024】

2. 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の部分DNA断片の単離

既知のペプチド合成酵素のマルチプルアライメントを行い、良好に保存された領域として、WTSMYDGとVVQYFPTを見出した。これらの配列を元に、5' - TGGACIW SNATGTAYGAYGG -3' (配列番号3) 及び5' - GTIGGRAARTAYTGIACNAC -3' (配列番号4) のプライマーを合成した。これらのプライマーを用い、PF1022物質生産菌から単離したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは、50 μ lの反応液中、ゲノムDNA50 ngを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファー及びdNTP Mixture、及び10 μ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94℃ 3分間、[94℃ 1分間、65℃ (1サイクル毎に0.5℃下げる) 1分間、72℃ 1分間] \times 30回、72℃ 3分間。この反応により約350 bpのDNA断片が増幅し、このDNA断片をOriginal TA Cloning Kit (インビトロジェン社) を用い、添付のプロトコールに従ってpCR2.1プラスミドベクターに挿入した。

【0025】

このようにしてクローニングしたDNA断片の塩基配列の決定は、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (パーキンエルマー社) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (パーキンエルマー社) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。その結果、単離したDNA断片の塩基配列は、ペプチド合成酵素遺伝子と相同性を示し、目的とする環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の一部であることが明らかとなった。

【0026】

3. 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子全域のクローニング

ゲノムライブラリーのスクリーニングに使用したプローブは、PCRにより、フ

フルオレセイン標識dUTPをDNA断片に取り込ませることにより調製した。PCRは、50 μ lの反応液中、100 ngの環状デブシペプチド合成酵素遺伝子DNA断片が挿入されたpCR2.1プラスミドベクターを鋳型とし、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社）及び添付のバッファー、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.02 mM dTTP、0.18 mM フルオレセイン標識dUTP（FluoroGreen、アマシャム社）及び10 μ Mのプライマー（配列番号3及び配列番号4）を用い、以下の条件で反応を行った。94℃ 2分間、（94℃ 30秒間、55℃ 1分間、72℃ 1分間） \times 25回、72℃ 3分間。この反応により、約350 bpのフルオレセイン標識プローブが作製された。

【0027】

実施例1の1において作製したブランクの形成されたプレート上に、Hybond-N+メンブレン（アマシャム社）を載せ、ブランクを付着させた。このメンブレンをアルカリ処理し、メンブレン上の組換えファージDNAを1本鎖に変性しメンブレンに吸着させた。ファージDNAが吸着したメンブレンを、Hybridization Buffer Tablets（アマシャム社）を用いて調製したバッファーに入れた後、60℃で1時間インキュベートした。これに、上記のフルオレセインでラベルされたプローブを熱変性して添加し、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、メンブレンを1 \times SSC（SSC：15 mMクエン酸3ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム）-0.1% SDS溶液中で60℃、15分間洗浄し、さらに、0.2 \times SSC-0.1% SDS溶液中で60℃、15分間洗浄した。フルオレセインが結合したブランクの可視化は、DIG洗浄ブロックバッファーセット（ベリンガー・マンハイム社）、アルカリフォスファターゼでラベルされた抗フルオレセイン抗体（Anti-fluorescein-AP, Fab fragment、ベリンガー・マンハイム社）、発色基質としてニトロブルーテトラゾリウムクロライド（ベリンガー・マンハイム社）及びX-フォスフェート（ベリンガー・マンハイム社）を用い、添付のプロトコールに従って行った。このようにしてプローブに相同な領域の5' 上流域及び3' 下流域を含む陽性クローンを選抜した。

【0028】

4. 塩基配列の決定

このようにして単離された陽性クローン中のDNA断片を、ファージベクターの配列である5' - GCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACGAA -3' (配列番号5) 及び5' - GCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAAGAA -3' (配列番号6) をプライマーとして用い、PCRにより増幅した。PCRは、50 μ lの反応液中、陽性クローンDNA100 ngを鋳型とし、2.5 unitのLA Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファー及びdNTP Mixture、2.5 mM塩化マグネシウム、及び0.2 μ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94℃ 1分間、(98℃ 10秒間、68℃ 15分間) \times 25回、72℃ 15分間。得られたPCR産物を精製した後、ネブライザー処理し、ランダムに0.5 kb \sim 2.0 kbに分解した。この断片の末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑化し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、pT7Blue (ノバジェン社) のEcoRV部位に挿入し、大腸菌JM109株に導入した。このようにして得られた168個のコロニーをM13 Primer M4 (宝酒造社) 及びM13 Primer RV (宝酒造社) を用いて直接PCRし、これを精製した後、M13 Primer M4 (宝酒造社) をプライマーとしてシーケンスを行った。PCRは、50 μ lの反応液中、1.25 unitのExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社)、添付のバッファー及びdNTP Mixture、及び0.5 μ Mのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。94℃ 4分間、(94℃ 30秒間、55℃ 30秒間、72℃ 2分間) \times 30回、72℃ 3分間。また、シーケンスは、DNA Sequencing Kit dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (パーキンエルマー社) とABI PRISM 310 Genetic Analyzer (パーキンエルマー社) を用いて、添付のプロトコールに従い行った。

【0029】

得られた結果から、解析が不十分な領域については、プライマーを解析済みの塩基配列を元に新たに設計してPCRにより増幅し、これを精製した後、PCRに用いたプライマーを用いてシーケンスを行った。これにより、陽性クローン中のDNA断片15606 bpの塩基配列を決定した。

【0030】

この配列を解析したところ9633 bpからなるオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、この配列から予測されるタンパク質は、3210アミノ酸残基、353 kDaであり、ペプチド合成酵素と相同性を示すことが明らかとなった。また、最

も高い相同性を示したタンパク質はエニアチン合成酵素 (S39842) であり、その相同性は56%であった。このように単離した本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子のORFの塩基配列を配列表の配列番号1に、またそのアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0031】

実施例2 環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の過剰発現によるPF1022生産性の向上

1. 遺伝子発現用の組換えベクターの構築 (図1)

実施例1の3で得られた陽性クローンから、挿入されたDNA断片をNotIにより切り出し、pBluescriptII KS+ (ストラタジーン社) のNotI部位に挿入し、プラスミドpPF7を作製した。pPF7をBanIII及びSmaIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約8250 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。この断片をpBluescriptII KS+に挿入し、プラスミドpPF7-1を作製した。

【0032】

pPF7を鋳型とし、N末端付近からBanIII部位までの約440 bp (配列番号7及び配列番号8を使用) 又は約470 bp (配列番号13及び配列番号8を使用) を増幅するためのプライマーとして、5' - AGCATCGGATCCTAACAATGGGCGTTGAGCAGCAAGCCCTA - 3' (配列番号7、ORFのN末端から9番目のMetから翻訳開始するように設計) 又は5' - AGCATCGGATCCTAACAATGTCAAACATGGCACCCTCCCTA - 3' (配列番号13、ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始するように設計)、及び5' - TTGCTTCGTACTCGG GTCCT - 3' (配列番号8) を用い、また、SmaI部位からC末端までの約920 bpを増幅するためのプライマーとして、5' - GCATCGGATACTAGAGAAG - 3' (配列番号9) 及び5' - AGCATCGAATTCGGATCCCTAAACCAACGCCAAAGCCCGAAT - 3' (配列番号10) を用いてPCRを行った。この際、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子の5' 側及び3' 側に、BamHI部位を導入するようにプライマーの設計を行った。PCRは、50 µlの反応液中、150 ngのプラスミドDNAを鋳型とし、2.5 unitのKOD DNAポリメラーゼ (東洋紡績社)、添付のバッファー及びdNTP Mixture、1 mM塩化マグネシウム、及び0.5 µMのプライマーを用い、以下の条件で反応を行った。98℃ 30秒間、(98℃ 15秒間、65℃ 2秒間、74℃ 30秒間) ×10回、74℃ 1分間

。各プライマーを用いて得られたPCR反応液をエタノール沈殿し、PCR産物を回収した。N末端領域に関しては、BamHI及びBanIIIにより、また、C末端領域に関しては、SmaI及びBamHIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動し、DNA断片をアガロースゲルから回収した。

【 0 0 3 3 】

pPF7-1のSmaI、BamHI部位に、上記のC末端領域PCR断片を挿入し、プラスミドpPF7-2を作製した。このプラスミドをBanIII及びBamHIで切断した後、アガロースゲル電気泳動し、約9170 bpのDNA断片をアガロースゲルから回収した。このDNA断片並びに配列番号7及び配列番号8を用いて作製したN末端領域を、同時に、pBluescript II KS+のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsyn(ORFのN末端から9番目のMetから翻訳開始)を作製した。

【 0 0 3 4 】

一方、pPF7-2から切り出した約9170 bpのDNA断片並びに配列番号7及び配列番号13を用いて作製したN末端領域を、同時に、pHSG299(宝酒造社)のBamHI部位に挿入することにより、本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を再構築し、プラスミドpPFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。このようにして両末端にBamHI部位を持つ環状デプシペプチド合成酵素遺伝子を作製した。

【 0 0 3 5 】

尚、プラスミドpPFsynで形質転換された大腸菌(大腸菌 DH5 α)は、FERM P-17541の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【 0 0 3 6 】

また、プラスミドpPFsynNで形質転換された大腸菌(大腸菌 DH5 α)は、FERM P-17542の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【 0 0 3 7 】

pPFsyn又はpPFsynNをBamHIで切断した後、環状デプシペプチド合成酵素遺伝子領域をそれぞれゲルから回収した。これを特願平11-252851号に記載のAbp1遺伝

子のプロモーター及びターミネーターを有するpABPdのBamHI部位に挿入し、本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子を発現させるための発現ベクターであるpABP/PFsyn(ORFのN末端から9番目のMetから翻訳開始)及びpABP/PFsynN(ORFのN末端1番目のMetから翻訳開始)を作製した。

【0038】

2. PF1022物質生産菌への環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の導入と発現

PF1022物質生産菌 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) への発現ベクターの導入は、W097/00944号に記載された実施例1の方法に従って行い、ハイグロマイシンBに対する耐性度の高い株を選抜した。これらの株における目的遺伝子の導入の確認は、*Abp1*プロモーターの配列から作製したプライマー、5' - TGATATGCTGG AGCTTCCCT -3' (配列番号11) 及び環状デブシペプチド合成酵素遺伝子の配列から作製したプライマー、5' - GCACAACCTCTTTCCAGGCT -3' (配列番号12) を用いたPCRにより行った。このようにしてハイグロマイシンBに対する耐性度が高く本発明の環状デブシペプチド合成酵素遺伝子が導入された遺伝子導入株を選抜した。

【0039】

50 mlの種培地にて遺伝子導入株及び親株 (*Mycelia sterilia*, FERM BP-2671) をそれぞれ別々に26℃で2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地 [6%水飴、2.6%澱粉、2%小麦胚芽、1%ファーマメディア、0.2%硫酸マグネシウム7水和物、0.2%炭酸カルシウム、0.3%塩化ナトリウム (pH 7.5)] に接種し、26℃で4日間培養した。培養液を4500rpmで5分間遠心することにより集菌し、得られたそれぞれの菌体を0.3 M塩化カリウムで洗浄した。それぞれの菌体を液体窒素により凍結した後、凍結乾燥を行った。

【0040】

以下に示す抽出操作は、氷上、又は4℃の低温室にて実施した。凍結乾燥した菌体10 mg及び1.0 mlのガラスビーズ (径0.5 mm) を入れた2 mlのマイクロチューブに、1.0 mlの抽出バッファー [50 mMトリス-塩酸 (pH8.0)、0.3 M塩化カリウム、60%グリセロール、10 mMエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム、5 mMジチオスレイトール、10 μMロイペプチン、1 mMフェニルメタンサルホン酸、60 μg/ml

1キモスタチン]を添加した。このマイクロチューブをMini-Bead-Beater-8 (バイオスペック社)にセットし、最高速度で3分間運転することにより抽出を行った。これを15000 rpmで5分間遠心した後、100 μ lの上清を100 μ lの10%トリクロロ酢酸溶液中に入れ、混合した。15分間放置した後、15000 rpmで10分間遠心し、得られた沈殿を、15 μ lのアルカリ溶液 (2%炭酸ナトリウム、0.4%水酸化ナトリウム)に溶解し、60 μ lのサンプルバッファー [125 mMトリス-塩酸 (pH6.8)、20%グリセロール、4%ドデシル硫酸ナトリウム、10% 2-メルカプトエタノール、50 mg/l ブロムフェノールブルー]を添加した。これを沸騰水中で5分間加熱した後、電気泳動システム (テフコ社)により、4%~20%のポリアクリルアミドゲルを使用して電気泳動 [Sodium Dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)]を行った。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルは、クイック-CBB (和光純薬社)を用い、添付のプロトコールに従い染色した。親株及びpABP/PFsynを導入した遺伝子導入株から抽出したタンパク質の電気泳動の結果を図2に示した。

【0041】

このように、遺伝子導入株の環状デプシペプチド合成酵素の発現量は、親株に比べ顕著に高かった。

【0042】

3. PF1022物質の抽出と定量

50 mlの種培地にて遺伝子導入株及び親株をそれぞれ別々に26℃で2日間培養した後、それぞれの培養液1 mlを50 mlの別々の生産培地に接種し、26℃で6日間培養した。それぞれの培養液から10 ml分を採取し3000 rpmで10分間遠心し、別々に集菌した。それぞれの菌体に10 mlのメタノールを加えて激しく振とうし、30分間静置した。その後、再度振とうし、3000 rpmで10分間遠心した後、上清中のそれぞれの菌体から抽出したPF1022物質を液体クロマトグラフィーにより各々定量した。カラムとしては、LiChrospher 100 RP-18 (e) (関東化学社)を用い、カラム温度は40℃、移動相は80%アセトニトリル、流速は1.0 ml/minとして、210 nmの吸収によりPF1022物質を検出した。この条件におけるPF1022物質の保持時間は5分間~6分間であった。実験は2反復で行い、親株及びpABP/PFsynを導入し

た遺伝子導入株から抽出したPF1022物質の定量結果の平均値を表 1 に示した。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

	PF1022物質 (μg/ml)
親株	88
遺伝子導入株	222

【 0 0 4 4 】

遺伝子導入株は親株の約2.5倍のPF1022物質の生産性を示した。本発明の環状デプシペプチド合成酵素を過剰発現させることにより、PF1022物質の生産性が高まることが明らかとなった。

【 0 0 4 5 】

【発明の効果】

本発明の環状デプシペプチド合成酵素遺伝子をPF1022物質生産菌に導入することにより、PF1022物質の生産性を向上させることができる。

【 0 0 4 6 】

【配列表】

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd

<120> Cyclodepsipeptide synthetase gene

<130> PM1533

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9633

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(9633)

<223> peptide synthetase for PF1022

<220>

<221> mat#peptide

<222> (13)..(9630)

<400> 1

atg tca aac atg gca cca ctc cct acg atg ggc gtt gag cag caa gcc 48

Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala

-1 1 5 10

cta tca ctt tca tgc ccc tta ctc cct cat gac gat gag aaa cac tca 96

Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser

15 20 25

gac aac ctt tac gag caa gca act cgg cac ttc ggc ttg agc cga gac 144

Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp

30 35 40

aag atc gaa aat gtc tta cca tgt act tcc ttt caa tgt gat gtc ata 192

Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile

45 50 55 60

gat tgc gcc gtc gac gat cgg cgg cat gct atc ggt cac gtc gtc tat 240

Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr

65

70

75

gat atc ccc aat aca gtg gac atc cag cgt tta gcc gca gcc tgg aaa 288

Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys

80

85

90

gag gtt gtg cgg cag aca cca atc ttg agg acc ggc atc ttt aca tca 336

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser

95

100

105

gaa acc ggc gac tct ttt cag atc gtc ttg aaa gaa ggc tgc cta ccg 384

Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro

110

115

120

tgg atg tac gcg aca tgt ctc ggc atg aag ggg gca gtg ata caa gat 432

Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp

125

130

135

140

gaa gca gtc gcc gct atg act gga ccg cgt tgc aat cga tat gtc gtc 480

Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val

145

150

155

ctg gag gac ccg agt acg aag caa agg ctg ctc atc tgg aca ttc agc 528

Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser

160

165

170

cat gct tta gtg gat tat aca gtc cag gaa cgc atc ctt cag cgg gtt 576

His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val

175

180

185

ctc aca gta tac gac ggc cgg gac gtc gag tgc cct cgc atc aag gat 624

Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp

190

195

200

aca gaa cat gtc tct cgg ttt tgg caa caa cac ttt gaa ggc tta gat 672

Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp

205

210

215

220

gcc tcc gta ttt ccc ctt cta cca tct cac cta act gtg tgc aat ccc 720

Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro

225

230

235

aat gcg cgc gca gaa cat cat atc tca tac acg gga cca gtc cag agg 768

Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg

240

245

250

aag tgg tcc cat aca agt atc tgt cgg gct gca ctc gca gtt ctt cta 816

Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu

255

260

265

tct cgc ttt aca cac tct tcg gag gcc ctc ttc ggt gtt gtg aca gaa 864

Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu

270

275

280

caa tct cac aac tcc gag gac caa aga cgg tca att gat ggc ccc gca 912

Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala

285

290

295

300

agg aca gta gtg cct atc cgc gtc ctt tgt gcc cca gat caa tat gtg 960

Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val

305

310

315

tcg gat gtc att ggg gca atc acc gca cac gaa cac gcc atg cgc ggg 1008

Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly

320

325

330

ttt gag cac gct gga ctt cgc aat atc cgc cgt acc gga gac gac ggg 1056

Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly

335

340

345

tct gct gct tgt gga ttc cag acc gtg cta ctg gtg act gac ggt gat 1104

Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp

350

355

360

gct ccc aag acc cct ggg agt gta ctt cat cga agt gta gaa gaa tcg 1152

Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser

365

370

375

380

gat aga ttc atg ccc tgc gct aat cgt gcc ctt ctg ctc gac tgc cag 1200

Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln

385

390

395

atg gct ggc aac tcg gca tcc cta gtc gca cga tat gat cat aat gtg 1248

Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val

400

405

410

atc gac cca cgc cag atg tct cgc ttc ctg cga cag cta gga tac ctg 1296

Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu

415

420

425

atc caa caa ttt cat cat cac gtc gat ctg cct ctg gtc aaa gaa ctg 1344

Ile Gln Gln Phe His His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu

430

435

440

gac gtc gtg acg gcg gag gat tgt gcg gaa atc gag aaa tgg aat tca 1392

Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser

445

450

455

460

gaa cgc cta aca atg caa gac gcc tta atc cac gac acc ata tcc aag 1440

Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys

465

470

475

tgg gct gct ggc gat ccc aac aaa gct gca gtt ttc gct tgg gat ggg 1488

Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly

480

485

490

gaa tgg aca tac gcc gag cta gac aac ata tcc tcc cgt ctc gcc gtg 1536

Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val

495

500

505

tat atc caa tcc ctg gac ttg aga cca gga caa gca ata ctc cca ctc 1584

Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu

510

515

520

tgc ttc gag aag tca aaa tgg gtc gtc gcc aca att ctc gcc gtc ctc 1632

Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu

525

530

535

540

aaa gtc ggt cgg gca ttc aca ctc atc gac ccg tgc gac ccc tcg gca 1680

Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala

545

550

555

agg atg gcc cag gtc tgt cag cag acc tcc gcc aca gtc gct ctc acc 1728

Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr

560

565

570

tcc aaa ctc cac aac acc acc tta cgt tcc gtc gtt tcc cgc tgc att 1776

Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile

575

580

585

gtg gtc gac gac gac ctc ctt cgg tcc tta ccc cac gcc gat ggc cgc 1824

Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg

590

595

600

tta aag gcc acc gtg aag cca cag gac ttg gcc tat gtt att ttc aca 1872

Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr

605

610

615

620

tct ggc agc aca gga gag ccg aaa ggc atc atg atc gaa cat cgg ggg 1920

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly

625

630

635

ttc gtg tcg tgt gct atg aaa ttt ggc ccc gcg ctc gga atg gat gag 1968

Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu

640

645

650

cac acg cgc gct ctt caa ttc gcc tca tat gcg ttt ggc gct tgt ctg 2016

His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu

655

660

665

gta gaa gtt gtg aca gct ctg atg cac ggc ggc tgc gtc tgc atc cct 2064

Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro

670

675

680

tcc gat gac gat cgc ttg aac aat gta ccg gag ttc atc aaa agg gcc 2112

Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala

685

690

695

700

cag gtg aac tgg gtg ata ctc act ccg tgc tat atc ggg aca ttc cag 2160

Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln

705

710

715

ccg gaa gat gtc cct gga cta caa aca ctg gta ttg gtt gga gaa cct 2208

Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro

720

725

730

atc tca gcg tct att cgg gat acc tgg gcc tcc cag gtt cga ctc ctg 2256

Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu

735

740

745

aat gcc tac ggt cag agt gaa agc tca act atg tgc agc gtc acg gaa 2304

Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu

750

755

760

gtc agc ccg ctc tcc ctc gaa ccg aac aat atc ggt cgg gct gta ggc 2352

Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly

765

770

775

780

gca cga tcc tgg atc att gat ccc gac gag cct gat cgt ctt gct cca 2400

Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro

785

790

795

att ggc tgc att gga gag cta gtg atc gaa agt ccg ggc att gcg cgc 2448

Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg

800

805

810

gac tat atc atc gcg ccg ccg gac aag tcc ccc ttt ctc cta gca 2496

Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala

815

820

825

ccc ccg gcc tgg tat cca gcc ggg aaa tta tcc aac gcc ttt aaa ttt 2544

Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe

830

835

840

tac aag act gga gat ctc gtg cgt tat gga cct gac ggc acc atc gtc 2592

Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val

845

850

855

860

tgc ctg gga cgc aaa gat tcg caa gtg aag atc cga ggg cag cgc gta 2640

Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val

865

870

875

gag atc agc gca gtg gaa gcc agt cta cga cga caa cta cct agt gac 2688

Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp

880

885

890

atc atg ccc gtg gcc gaa gct atc aaa cgc tcg gat tcg tca ggc agc 2736

Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser

895

900

905

aca gtc ttg act gcc ttc ttg ata ggg tca tct aag agc gga gat ggt 2784

Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly

910

915

920

aat ggc cac gct tta tct gcg gca gac gcc gtt atc ttg gat cac ggt 2832

Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly

925

930

935

940

gct acc aac gag ata aac gcg aag ttg cag caa atc ctt ccc cag cat 2880

Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His

945

950

955

tcc gtt cca tcc tat tat atc cac atg gaa aat ctt cct cga act gcc 2928

Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala

960

965

970

acc ggc aaa gcg gac agg aaa atg ctt cga tct att gct agc aag cta 2976

Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu

975

980

985

ttg ggt gaa ttg tct cag aac gtg aca tct caa ccg att gag aag cac 3024

Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His

990

995

1000

gat gcc cca gca act ggt ata gag gtc aag ctg aag gag ctt tgg ttt 3072

Asp Ala Pro Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe

1005

1010

1015

1020

ctg agc ttg aat ctt aat ccc aac tct caa gat gtc gga gcg agt ttc 3120

Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe

1025

1030

1035

ttt gac tta ggc gga aat tcc att atc gcc atc aaa atg gta aac atg 3168

Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met

1040

1045

1050

gcg agg tca gct ggg ata gca ctg aag gta tcc gac ata ttc cag aat 3216

Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn

1055

1060

1065

ccc acg ctc gcc ggc ctt gtg gat gtc atc ggg cga gac ccg gct ccg 3264

Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro

1070

1075

1080

tac aac ctc atc cca aca aca gca tac agc gga cct gtt gag cag tcg 3312

Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser

1085

1090

1095

1100

ttc gcc cag ggc cgt cta tgg ttc ttg gac cag atc gaa ctc gat gcg 3360

Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala

1105

1110

1115

ttg tgg tac ctt cta cca tac gcc gtt cgc atg cgc ggg cca ttg cat 3408

Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His

1120

1125

1130

att gat gcg ctc act att gcg ttg cta gct ata cag caa cga cat gaa 3456

Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu

1135

1140

1145

acc ttg cgg aca acc ttt gag gag cag gac ggc gta ggc gtt cag gtt 3504

Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val

1150

1155

1160

gtc cat gcg agc ccc atc tcc gac ttg agg ata atc gac gta tca ggc 3552

Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly

1165 1170 1175 1180

gac cga aac agt gac tac ctc cag ttg cta cac caa gag cag acg act 3600

Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr

1185 1190 1195

cca ttc att cta gca tgt cag gca gga tgg agg gta tca ctg att aga 3648

Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg

1200 1205 1210

cta gga gaa gat gat cac atc ctc tct atc gta atg cat cac atc atc 3696

Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile

1215

1220

1225

tcc gac ggc tgg tct atc gac att cta cgc cgg gaa cta agc aat ttc 3744

Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe

1230

1235

1240

tat tca gcc gct ctc cgg ggc tct gat cct cta tcg gtg gtg agc cca 3792

Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp Pro Leu Ser Val Val Ser Pro

1245

1250

1255

1260

ctc cca ctc cac tac cgc gac ttt tcc gtt tgg caa aag cag gtc gaa 3840

Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu

1265

1270

1275

cag gag acc gaa cat gag cgg caa ctc gaa tac tgg gtc aag cag ctc 3888

Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu

1280

1285

1290

gca gac agc tcg gcc gcc gaa ttc cta acc gac ttc ccc cga ccc aac 3936

Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn

1295

1300

1305

ata ctg tcc ggt gaa gca ggt tcc gtg cca gtg acg atc gaa ggc gaa 3984

Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu

1310

1315

1320

ctg tat gaa agg ctc caa gaa ttc tgt aaa gta gag caa atg acg cct 4032

Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro

1325

1330

1335

1340

ttc gcc gtg ttg tta ggg gcc ttc cgc gcg acc cat tat cgt ctc acc 4080

Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr

1345

1350

1355

ggc gcc gaa gac tcg atc atc ggc acg ccc atc gcg aac cgc aac cgc 4128

Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg

1360

1365

1370

cag gag ctt gaa aac atg atc ggc ttc ttc gtc aac acc caa tgc atg 4176

Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met

1375

1380

1385

cga atc acg gtc gac ggc gac gac act ttt gaa agc ctg gtg cga caa 4224

Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln

1390

1395

1400

gtt cgg acc acg gcg acg gcg gca ttc gag cac caa gac gtc ccc ttt 4272

Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe

1405

1410

1415

1420

gag cgc gtc gtg acg gca ctc ctt cca cgc tcg aga gac cta tcc cga 4320

Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg

1425

1430

1435

aac cca cta gca cag ctc acc ttc gct ctt cat tct caa cag gac ctc 4368

Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu

1440

1445

1450

ggc aag ttc gag ctg gag ggt ctc gta gcg gaa ccc gtc tcg aac aag 4416

Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys

1455

1460

1465

gta tac acc agg ttc gac gtg gag ttt cac ctg ttc caa gaa gcc gga 4464

Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly

1470

1475

1480

aga cta agc ggt aac gtg gca ttt gcg gca gat cta ttc aag cct gag 4512

Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu

1485

1490

1495

1500

acc att agc aat gta gtc gcc ata ttt ttc caa atc ctg cga caa ggc 4560

Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly

1505

1510

1515

att cgc cag cct cgg act cca atc gct gtt ctc ccg ctt acc gat ggg 4608

Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly

1520

1525

1530

tta gcg gac ctt cgt gcc atg ggc ttg ctt gag atc gag aag gca gaa 4656

Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu

1535

1540

1545

tac ccg cgg gag tcg agc gtc gtc gac gtc ttc cgc aag cag gtg gcc 4704

Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala

1550

1555

1560

gct cac ccg cac gct ttt gcc gtt gtc gat tcg gca tcg cgc ctc aca 4752

Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr

1565

1570

1575

1580

tat gct gat ctc gat cgt caa tcc gat caa ctc gcg acc tgg ctc ggt 4800

Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly

1585

1590

1595

cgg cgc aat atg acg gct gag acg ctg gtc ggg gtg tta gca ccg cgg 4848

Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg

1600

1605

1610

tca tgt caa aca gtt gtt gcc att tta ggt atc ctg aaa gcg aat ctc 4896

Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu

1615

1620

1625

gca tat ctc ccg ctt gat gtg aat tgt cct acc gcc cgc ctg caa aca 4944

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr

1630

1635

1640

atc cta tct aca ttg aat cgg cac aag ttg gtc cta ctc ggc tct aac 4992

Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn

1645

1650

1655

1660

gca act act ccg gat gtc cag ata cct gat gta gag ctg gta cga atc 5040

Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile

1665

1670

1675

agc gat atc tta gat cgc ccc atc aat ggc cag gca aag cta aat ggt 5088

Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly

1680

1685

1690

cat aca aaa tcg aat ggc tac tca aag cca aac ggc tat acg cat ctg 5136

His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu

1695

1700

1705

aaa ggc tat tca aac cta aac ggt tat tca aaa caa aat ggt tat gca 5184

Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala

1710

1715

1720

caa ctc aac ggc cat aga gag cgt aac aat tat tta gat cta aat ggg 5232

Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly

1725

1730

1735

1740

cac tca ctg cta aat ggg aat tca gac atc acc aca tca ggg ccc tca 5280

His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser

1745

1750

1755

gca aca agc ctt gcc tac gtg atc ttc aca tcc ggc tca acc gga aag 5328

Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys

1760

1765

1770

ccc aaa gga gtc atg gtc gaa cac cgc agc atc atc cga ctt gca aag 5376

Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys

1775

1780

1785

aag aac aga atc ata tcc agg ttc cca tct gta gcc aag gta gct cac 5424

Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His

1790

1795

1800

ctc tca aac atc gcc ttt gac gcc gcc act tgg gaa atg ttc gca gcc 5472

Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala

1805

1810

1815

1820

ctt cta aac ggc gga acg ctg gtc tgt atc gac tat atg acc acc ctg 5520

Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu

1825

1830

1835

gac agc aaa acg ctc gag gcc gcg ttt gca cga gaa caa atc aac gcc 5568

Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala

1840

1845

1850

gcg tta ctc acg ccc gct ttg ttg aag cag tgc cta gcc aac att ccc 5616

Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro

1855

1860

1865

act acc cta ggc agg ctg agt gca ctc gtt att gga ggt gat agg ctt 5664

Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu

1870

1875

1880

gac ggc caa gac gcg atc gca gca cat gcg ctt gtc ggt gct ggc gtg 5712

Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val

1885

1890

1895

1900

tat aat gcg tat ggc ccg acc gaa aac gga gtg atc agt acg att tat 5760

Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr

1905

1910

1915

aat atc act aaa aac gac tcg ttc atc aac gga gtc ccc atc ggc tgt 5808

Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys

1920

1925

1930

gca atc agc aat tcc ggc gcc tac atc aca gac cca gac cag cag ctc 5856

Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu

1935

1940

1945

gta cct cct ggc gtc atg ggt gaa ctc gtc gtt acc ggt gac ggg ctc 5904

Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu

1950

1955

1960

gcg cgg ggg tat aca gac cca gca cta gac gcg ggc cgc ttc gtc cag 5952

Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln

1965

1970

1975

1980

atc atg atc aat gac aag gcc gtg agg gcg tac cga acg ggt gac cgg 6000

Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg

1985

1990

1995

gca cga tat cgc gta gga gac ggt cag atc gag ttc ttc gga cgc atg 6048

Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met

2000

2005

2010

gat cag caa gtc aag atc cga ggt cac cgc att gaa cca gcc gaa gtg 6096

Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val

2015

2020

2025

gag cgt gct att ctc gac caa gac tcg gcc cgc gac gcc gtc gtt gtc 6144

Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val

2030

2035

2040

atc cgg cac caa gaa ggt gaa gaa ccg gag atg gtt ggt ttc gtc gcg 6192

Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala

2045

2050

2055

2060

acc cac ggc gat cac tct gcc gaa caa gag gaa gca gac gac cag gtt 6240

Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Glu Ala Asp Asp Gln Val

2065

2070

2075

gaa ggt tgg aaa gac ttc ttc gag agc aat aca tat gcc gac atg gat 6288

Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp

2080

2085

2090

acc atc ggc cag tct gct ata ggc aac gac ttt acg ggc tgg acg tcc 6336

Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser

2095

2100

2105

atg tac gac ggg agc gag atc aac aag gcc gag atg cag gag tgg ctc 6384

Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu

2110

2115

2120

gac gac acc atg cgc aca ctc ctc gat ggc caa gcg ccg ggt cac gta 6432

Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val

2125

2130

2135

2140

ctc gaa ata ggc aca ggc agt ggc atg gta ttg ttt aac tta ggg gcc 6480

Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala

2145

2150

2155

ggg cta caa agc tac gta ggt ctt gaa cca tct aga tct gca gcc acg 6528

Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr

2160

2165

2170

ttt gtt acc aaa gcg atc aat tcc acc cca gct ctt gca gga aag gcc 6576

Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala

2175

2180

2185

gaa gtg cac gtc ggc aca gcg aca gac ata aac cga ctt cgt gga ctt 6624

Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu

2190

2195

2200

cgt ccc gat cta gtt gtg ctc aac tcg gta gtc cag tat ttc ccc acg 6672

Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

2205

2210

2215

2220

ccc gag tac cta cta gag gtc gtg gag agt ctc gtc cgg att ccg ggc 6720

Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly

2225

2230

2235

gtc aag cgc gtg gtc ttc ggc gac ata cga tct cac gcc acg aac aga 6768

Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg

2240

2245

2250

cat ttt ctt gct gcc agg gcg ctg cat tcg ctg ggc tcc aag gcg acc 6816

His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr

2255

2260

2265

aaa gat gct ata cgt caa aag atg acg gag atg gaa gag cgc gag gaa 6864

Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu

2270

2275

2280

gag ctg ctc gtc gac ccg gcc ttc ttc acg gcg ctg ctg cag ggc cag 6912

Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln

2285

2290

2295

2300

ctt gcc gat cga atc aag cac gtc gag atc ctc ccg aag aac atg cgc 6960

Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg

2305

2310

2315

gcc acg aac gag ctg agc gcg tac cgg tat aca gcc gtc att cac gta 7008

Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val

2320

2325

2330

cgc ggc cca gag gaa cag tcg cgg ccc gtg tat ccg atc caa gtg aac 7056

Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn

2335

2340

2345

gac tgg atc gac ttt cag gcc tca cgc att gac cgc cgc gcc ctt ctc 7104

Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu

2350

2355

2360

cga ctc cta cag cgc tcg gca gac gcc gcg acc gtc gcc gtc agc aac 7152

Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn

2365

2370

2375

2380

atc ccc tac agc aag acg att gta gaa cgc cat gtc gtc gag tcc ctt 7200

Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu

2385

2390

2395

gac aat aac aac agg gag aat acg cat aga gca cca gac ggc gcg gct 7248

Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala

2400

2405

2410

tgg atc tcg gcc gtc cgc tcc aag gcc gag cgc tgc acg tcc ctc tcc 7296

Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser

2415

2420

2425

gtg acc gat ctt gtg cag ctc ggg gaa gaa gcc ggc ttt cgc gta gaa 7344

Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu

2430

2435

2440

gtc agc gca gcg cgg cag tgg tct caa agc ggc gcg ctc gat gcc gtc 7392

Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val

2445

2450

2455

2460

ttt cac cgc tat aat ttg ccc act caa agc aat agt cgc gtt ctg att 7440

Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile

2465

2470

2475

cag ttc cct acc gaa gat ggc cag acg cga aga tcc gcc act ctg aca 7488

Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr

2480

2485

2490

aac cga cca cta cag cgt ctg cag agc cgt cgg ttc gca tca cag atc 7536

Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile

2495

2500

2505

cgc gaa cag ctg aag gcc gtg ctc ccg tca tac atg atc ccc tcc cgc 7584

Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg

2510

2515

2520

atc gtg gtc ata gac cag atg cct ctc aat gcc aat ggc aag gtc gac 7632

Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp

2525

2530

2535

2540

cgg aaa gaa ctt acc aga agg gcc caa atc gcg ccg aaa tct cag gcg 7680

Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala

2545

2550

2555

gct ccc gcc aaa ccc gtc aaa cag gtc gat ccg ttc gtc aac ctg gaa 7728

Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu

2560

2565

2570

gcc att tta tgt gag gag ttc gcg gag gtg ctg ggc atg gaa gtc ggc 7776

Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly

2575

2580

2585

gtg aac gac cac ttc ttc caa cta ggc gga cac tct ctc ttg gcc acg 7824

Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr

2590

2595

2600

aag ctc gtc gcg cgt ctc agt cgt cgg cta aac ggt cgt gtg tct gtg 7872

Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val

2605

2610

2615

2620

agg gat gtg ttc gac cag cct gtg att tcc gac ctc gca gtc acc ctc 7920

Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu

2625

2630

2635

cgc cag gga ctg acc ttg gaa aac gcc att ccc gca acg ccg gac agc 7968

Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser

2640

2645

2650

ggg tat tgg gag cag aca atg tcc gca ccg aca acc ccg agc gac gac 8016

Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp

2655

2660

2665

atg gag gcc gtg cta tgc aag gag ttt gcg gat gtg ctt ggc gtc gaa 8064

Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu

2670

2675

2680

gtc agc gcc acc gac agc ttc ttc gat ctc ggt ggg cat tcc ctc atg 8112

Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met

2685

2690

2695

2700

gct acg aag ctc gct gcg cgt att agc cgt cgg cta gat gta ccg gtg 8160

Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val

2705

2710

2715

tca atc aaa gac ata ttc gat cac tca gtt cct cta aac ctt gcg agg 8208

Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg

2720

2725

2730

aag att cgg ctc act caa gca aaa ggc cac gaa gcg acc aat gga gta 8256

Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val

2735

2740

2745

caa atc gcc aac gac gcc cca ttc caa ctc att tcc gta gaa gat cca 8304

Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro

2750

2755

2760

gag ata ttc gtc caa cgt gaa atc gcc cct caa cta caa tgc tca ccc 8352

Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro

2765

2770

2775

2780

gag aca atc cta gac gtc tac ccc gcc acg caa atg caa agg gtc ttc 8400

Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe

2785

2790

2795

ctc ctc aac cca gta aca gga aag ccg cgc tca cca acg cca ttt cac 8448

Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His

2800

2805

2810

ata gac ttc ccg ccg gac gca gac tgc gcc agc ctg atg cgg gca tgt 8496

Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys

2815

2820

2825

gca tct cta gcg aag cat ttc gat atc ttc agg acg gtg ttc ctc gaa 8544

Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu

2830

2835

2840

gcc aga ggc gaa ctc tac caa gta gtt cta aaa cac gtc gac gtg ccc 8592

Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro

2845

2850

2855

2860

atc gag atg ctc cag acc gaa gaa aac atc aac agc gcg acc cgg tcg 8640

Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser

2865

2870

2875

ttc ctg gac gta gac gca gaa aaa ccc atc cgg cta ggc cag cca ctg 8688

Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu

2880

2885

2890

atc cgc atc gcg ata cta gag aag ccc ggg tcc acg ctg cgc gtc atc 8736

Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile

2895

2900

2905

cta cga tta tcc cac gcc tta tac gac ggc ctg agc cta gag cac atc 8784

Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile

2910

2915

2920

ctg cac tct ctg cac atc ctc ttt ttc ggc ggc agt ctt ccc ccg ccg 8832

Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro

2925

2930

2935

2940

ccc aag ttc gcc ggg tac atg caa cac gtc gcg agc agt cgc aga gaa 8880

Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu

2945

2950

2955

ggc tac gat ttc tgg cgt tcc gtt ctc cga gat tcg tct atg aca gtc 8928

Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val

2960

2965

2970

atc aaa ggc aac aat aat aca act cca cca cct cct cct caa caa caa 8976

Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln

2975

2980

2985

tcc acc ccc tcc gga gcc cac cac gcc tcc aaa gta gtc act atc cca 9024

Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro

2990

2995

3000

acc caa gcc aac aca gac agc cgg atc acg cgc gcc acg atc ttc act 9072

Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr

3005

3010

3015

3020

acc gct tgc gca cta atg ctc gcg aaa gaa gac aac tcc agc gac gtc 9120

Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val

3025

3030

3035

gtc ttc ggg cgt acg gta tcg ggg cgt caa ggc ctg ccc cta gcc cac 9168

Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His

3040

3045

3050

caa aac gtg atc gga cca tgt ctc aac caa gtg ccc gtg cgc gcg cgc 9216

Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg

3055

3060

3065

ggt tta aac cga gga acc act cac cac cga gaa ctt ctc cgc gag atg 9264

Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met

3070

3075

3080

caa gag caa tat ctc aac agt ctc gct ttc gaa act ctc ggg tac gac 9312

Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp

3085

3090

3095

3100

gag atc aag gcg cac tgc aca gac tgg ccg gac gtg cca gcg acc gcg 9360

Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala

3105

3110

3115

agc ttc ggg tgc tgc atc gtg tac cag aac ttc gat tcg cac ccg gac 9408

Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp

3120

3125

3130

agc cga gtc gaa gag cag cgg ctg cag atc ggg gtc ttg tgc cgg aac 9456

Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn

3135

3140

3145

tac gag gct att aat gag ggg ctc gtg cat gat ctt gtt att gct ggg 9504

Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly

3150

3155

3160

gag tgc gag cct gat ggg gat gat ttg agg gtt act gtt gtg gcg aat 9552

Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn

3165

3170

3175

3180

cgg agg ttg tgc gat gag gaa agg ttg aag agg atg ctg gag gag ctg 9600

Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu

3185

3190

3195

tgt ggg aat att cgg gct ttg gcg ttg gtt tag

9633

Cys Gly Asn Ile Arg Ala Leu Ala Leu Val

3200

3205

<210> 2

<211> 3210

<212> PRT

<213> Mycelia sterilia

<400> 2

Met Ser Asn Met Ala Pro Leu Pro Thr Met Gly Val Glu Gln Gln Ala

1

5

10

15

Leu Ser Leu Ser Cys Pro Leu Leu Pro His Asp Asp Glu Lys His Ser

20

25

30

Asp Asn Leu Tyr Glu Gln Ala Thr Arg His Phe Gly Leu Ser Arg Asp

35

40

45

Lys Ile Glu Asn Val Leu Pro Cys Thr Ser Phe Gln Cys Asp Val Ile

50

55

60

Asp Cys Ala Val Asp Asp Arg Arg His Ala Ile Gly His Val Val Tyr

65

70

75

80

Asp Ile Pro Asn Thr Val Asp Ile Gln Arg Leu Ala Ala Ala Trp Lys

85

90

95

Glu Val Val Arg Gln Thr Pro Ile Leu Arg Thr Gly Ile Phe Thr Ser

100

105

110

Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gln Ile Val Leu Lys Glu Gly Cys Leu Pro

115

120

125

Trp Met Tyr Ala Thr Cys Leu Gly Met Lys Gly Ala Val Ile Gln Asp

130

135

140

Glu Ala Val Ala Ala Met Thr Gly Pro Arg Cys Asn Arg Tyr Val Val

145

150

155

160

Leu Glu Asp Pro Ser Thr Lys Gln Arg Leu Leu Ile Trp Thr Phe Ser

165

170

175

His Ala Leu Val Asp Tyr Thr Val Gln Glu Arg Ile Leu Gln Arg Val

180

185

190

Leu Thr Val Tyr Asp Gly Arg Asp Val Glu Cys Pro Arg Ile Lys Asp

195

200

205

Thr Glu His Val Ser Arg Phe Trp Gln Gln His Phe Glu Gly Leu Asp

210

215

220

Ala Ser Val Phe Pro Leu Leu Pro Ser His Leu Thr Val Cys Asn Pro

225

230

235

240

Asn Ala Arg Ala Glu His His Ile Ser Tyr Thr Gly Pro Val Gln Arg

245

250

255

Lys Trp Ser His Thr Ser Ile Cys Arg Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu

260

265

270

Ser Arg Phe Thr His Ser Ser Glu Ala Leu Phe Gly Val Val Thr Glu

275

280

285

Gln Ser His Asn Ser Glu Asp Gln Arg Arg Ser Ile Asp Gly Pro Ala

290

295

300

Arg Thr Val Val Pro Ile Arg Val Leu Cys Ala Pro Asp Gln Tyr Val

305

310

315

320

Ser Asp Val Ile Gly Ala Ile Thr Ala His Glu His Ala Met Arg Gly

325

330

335

Phe Glu His Ala Gly Leu Arg Asn Ile Arg Arg Thr Gly Asp Asp Gly

340

345

350

Ser Ala Ala Cys Gly Phe Gln Thr Val Leu Leu Val Thr Asp Gly Asp

355

360

365

Ala Pro Lys Thr Pro Gly Ser Val Leu His Arg Ser Val Glu Glu Ser

370

375

380

Asp Arg Phe Met Pro Cys Ala Asn Arg Ala Leu Leu Leu Asp Cys Gln

385

390

395

400

Met Ala Gly Asn Ser Ala Ser Leu Val Ala Arg Tyr Asp His Asn Val

405

410

415

Ile Asp Pro Arg Gln Met Ser Arg Phe Leu Arg Gln Leu Gly Tyr Leu

420

425

430

Ile Gln Gln Phe His His His Val Asp Leu Pro Leu Val Lys Glu Leu

435

440

445

Asp Val Val Thr Ala Glu Asp Cys Ala Glu Ile Glu Lys Trp Asn Ser

450

455

460

Glu Arg Leu Thr Met Gln Asp Ala Leu Ile His Asp Thr Ile Ser Lys

465

470

475

480

Trp Ala Ala Gly Asp Pro Asn Lys Ala Ala Val Phe Ala Trp Asp Gly

485

490

495

Glu Trp Thr Tyr Ala Glu Leu Asp Asn Ile Ser Ser Arg Leu Ala Val

500

505

510

Tyr Ile Gln Ser Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ile Leu Pro Leu

515

520

525

Cys Phe Glu Lys Ser Lys Trp Val Val Ala Thr Ile Leu Ala Val Leu

530

535

540

Lys Val Gly Arg Ala Phe Thr Leu Ile Asp Pro Cys Asp Pro Ser Ala

545

550

555

560

Arg Met Ala Gln Val Cys Gln Gln Thr Ser Ala Thr Val Ala Leu Thr

565

570

575

Ser Lys Leu His Asn Thr Thr Leu Arg Ser Val Val Ser Arg Cys Ile

580

585

590

Val Val Asp Asp Asp Leu Leu Arg Ser Leu Pro His Ala Asp Gly Arg

595

600

605

Leu Lys Ala Thr Val Lys Pro Gln Asp Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr

610

615

620

Ser Gly Ser Thr Gly Glu Pro Lys Gly Ile Met Ile Glu His Arg Gly

625

630

635

640

Phe Val Ser Cys Ala Met Lys Phe Gly Pro Ala Leu Gly Met Asp Glu

645

650

655

His Thr Arg Ala Leu Gln Phe Ala Ser Tyr Ala Phe Gly Ala Cys Leu

660

665

670

Val Glu Val Val Thr Ala Leu Met His Gly Gly Cys Val Cys Ile Pro

675

680

685

Ser Asp Asp Asp Arg Leu Asn Asn Val Pro Glu Phe Ile Lys Arg Ala

690

695

700

Gln Val Asn Trp Val Ile Leu Thr Pro Ser Tyr Ile Gly Thr Phe Gln

705

710

715

720

Pro Glu Asp Val Pro Gly Leu Gln Thr Leu Val Leu Val Gly Glu Pro

725

730

735

Ile Ser Ala Ser Ile Arg Asp Thr Trp Ala Ser Gln Val Arg Leu Leu

740

745

750

Asn Ala Tyr Gly Gln Ser Glu Ser Ser Thr Met Cys Ser Val Thr Glu

755

760

765

Val Ser Pro Leu Ser Leu Glu Pro Asn Asn Ile Gly Arg Ala Val Gly

770

775

780

Ala Arg Ser Trp Ile Ile Asp Pro Asp Glu Pro Asp Arg Leu Ala Pro

785

790

795

800

Ile Gly Cys Ile Gly Glu Leu Val Ile Glu Ser Pro Gly Ile Ala Arg

805

810

815

Asp Tyr Ile Ile Ala Pro Pro Pro Asp Lys Ser Pro Phe Leu Leu Ala

820

825

830

Pro Pro Ala Trp Tyr Pro Ala Gly Lys Leu Ser Asn Ala Phe Lys Phe

835

840

845

Tyr Lys Thr Gly Asp Leu Val Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Thr Ile Val

850

855

860

Cys Leu Gly Arg Lys Asp Ser Gln Val Lys Ile Arg Gly Gln Arg Val

865

870

875

880

Glu Ile Ser Ala Val Glu Ala Ser Leu Arg Arg Gln Leu Pro Ser Asp

885

890

895

Ile Met Pro Val Ala Glu Ala Ile Lys Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser

900

905

910

Thr Val Leu Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ser Ser Lys Ser Gly Asp Gly

915

920

925

Asn Gly His Ala Leu Ser Ala Ala Asp Ala Val Ile Leu Asp His Gly

930

935

940

Ala Thr Asn Glu Ile Asn Ala Lys Leu Gln Gln Ile Leu Pro Gln His

945

950

955

960

Ser Val Pro Ser Tyr Tyr Ile His Met Glu Asn Leu Pro Arg Thr Ala

965

970

975

Thr Gly Lys Ala Asp Arg Lys Met Leu Arg Ser Ile Ala Ser Lys Leu

980

985

990

Leu Gly Glu Leu Ser Gln Asn Val Thr Ser Gln Pro Ile Glu Lys His

995

1000

1005

Asp Ala Pr Ala Thr Gly Ile Glu Val Lys Leu Lys Glu Leu Trp Phe

1010

1015

1020

Leu Ser Leu Asn Leu Asn Pro Asn Ser Gln Asp Val Gly Ala Ser Phe

025

1030

1035

1040

Phe Asp Leu Gly Gly Asn Ser Ile Ile Ala Ile Lys Met Val Asn Met

1045

1050

1055

Ala Arg Ser Ala Gly Ile Ala Leu Lys Val Ser Asp Ile Phe Gln Asn

1060

1065

1070

Pro Thr Leu Ala Gly Leu Val Asp Val Ile Gly Arg Asp Pro Ala Pro

1075

1080

1085

Tyr Asn Leu Ile Pro Thr Thr Ala Tyr Ser Gly Pro Val Glu Gln Ser

1090

1095

1100

Phe Ala Gln Gly Arg Leu Trp Phe Leu Asp Gln Ile Glu Leu Asp Ala

105

1110

1115

1120

Leu Trp Tyr Leu Leu Pro Tyr Ala Val Arg Met Arg Gly Pro Leu His

1125

1130

1135

Ile Asp Ala Leu Thr Ile Ala Leu Leu Ala Ile Gln Gln Arg His Glu

1140

1145

1150

Thr Leu Arg Thr Thr Phe Glu Glu Gln Asp Gly Val Gly Val Gln Val

1155

1160

1165

Val His Ala Ser Pro Ile Ser Asp Leu Arg Ile Ile Asp Val Ser Gly

1170

1175

1180

Asp Arg Asn Ser Asp Tyr Leu Gln Leu Leu His Gln Glu Gln Thr Thr

185

1190

1195

1200

Pro Phe Ile Leu Ala Cys Gln Ala Gly Trp Arg Val Ser Leu Ile Arg

1205

1210

1215

Leu Gly Glu Asp Asp His Ile Leu Ser Ile Val Met His His Ile Ile

1220

1225

1230

Ser Asp Gly Trp Ser Ile Asp Ile Leu Arg Arg Glu Leu Ser Asn Phe

1235

1240

1245

Tyr Ser Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asp Pro Leu Ser Val Val Ser Pro

1250

1255

1260

Leu Pro Leu His Tyr Arg Asp Phe Ser Val Trp Gln Lys Gln Val Glu

265

1270

1275

1280

Gln Glu Thr Glu His Glu Arg Gln Leu Glu Tyr Trp Val Lys Gln Leu

1285

1290

1295

Ala Asp Ser Ser Ala Ala Glu Phe Leu Thr Asp Phe Pro Arg Pro Asn

1300

1305

1310

Ile Leu Ser Gly Glu Ala Gly Ser Val Pro Val Thr Ile Glu Gly Glu

1315

1320

1325

Leu Tyr Glu Arg Leu Gln Glu Phe Cys Lys Val Glu Gln Met Thr Pro

1330

1335

1340

Phe Ala Val Leu Leu Gly Ala Phe Arg Ala Thr His Tyr Arg Leu Thr

345

1350

1355

1360

Gly Ala Glu Asp Ser Ile Ile Gly Thr Pro Ile Ala Asn Arg Asn Arg

1365

1370

1375

Gln Glu Leu Glu Asn Met Ile Gly Phe Phe Val Asn Thr Gln Cys Met

1380

1385

1390

Arg Ile Thr Val Asp Gly Asp Asp Thr Phe Glu Ser Leu Val Arg Gln

1395

1400

1405

Val Arg Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Glu His Gln Asp Val Pro Phe

1410

1415

1420

Glu Arg Val Val Thr Ala Leu Leu Pro Arg Ser Arg Asp Leu Ser Arg

425

1430

1435

1440

Asn Pro Leu Ala Gln Leu Thr Phe Ala Leu His Ser Gln Gln Asp Leu

1445

1450

1455

Gly Lys Phe Glu Leu Glu Gly Leu Val Ala Glu Pro Val Ser Asn Lys

1460

1465

1470

Val Tyr Thr Arg Phe Asp Val Glu Phe His Leu Phe Gln Glu Ala Gly

1475

1480

1485

Arg Leu Ser Gly Asn Val Ala Phe Ala Ala Asp Leu Phe Lys Pro Glu

1490

1495

1500

Thr Ile Ser Asn Val Val Ala Ile Phe Phe Gln Ile Leu Arg Gln Gly

505

1510

1515

1520

Ile Arg Gln Pro Arg Thr Pro Ile Ala Val Leu Pro Leu Thr Asp Gly

1525

1530

1535

Leu Ala Asp Leu Arg Ala Met Gly Leu Leu Glu Ile Glu Lys Ala Glu

1540

1545

1550

Tyr Pro Arg Glu Ser Ser Val Val Asp Val Phe Arg Lys Gln Val Ala

1555

1560

1565

Ala His Pro His Ala Phe Ala Val Val Asp Ser Ala Ser Arg Leu Thr

1570

1575

1580

Tyr Ala Asp Leu Asp Arg Gln Ser Asp Gln Leu Ala Thr Trp Leu Gly

585

1590

1595

1600

Arg Arg Asn Met Thr Ala Glu Thr Leu Val Gly Val Leu Ala Pro Arg

1605

1610

1615

Ser Cys Gln Thr Val Val Ala Ile Leu Gly Ile Leu Lys Ala Asn Leu

1620

1625

1630

Ala Tyr Leu Pro Leu Asp Val Asn Cys Pro Thr Ala Arg Leu Gln Thr

1635

1640

1645

Ile Leu Ser Thr Leu Asn Arg His Lys Leu Val Leu Leu Gly Ser Asn

1650

1655

1660

Ala Thr Thr Pro Asp Val Gln Ile Pro Asp Val Glu Leu Val Arg Ile

665

1670

1675

1680

Ser Asp Ile Leu Asp Arg Pro Ile Asn Gly Gln Ala Lys Leu Asn Gly

1685

1690

1695

His Thr Lys Ser Asn Gly Tyr Ser Lys Pro Asn Gly Tyr Thr His Leu

1700

1705

1710

Lys Gly Tyr Ser Asn Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gln Asn Gly Tyr Ala

1715

1720

1725

Gln Leu Asn Gly His Arg Glu Arg Asn Asn Tyr Leu Asp Leu Asn Gly

1730

1735

1740

His Ser Leu Leu Asn Gly Asn Ser Asp Ile Thr Thr Ser Gly Pro Ser

745

1750

1755

1760

Ala Thr Ser Leu Ala Tyr Val Ile Phe Thr Ser Gly Ser Thr Gly Lys

1765

1770

1775

Pro Lys Gly Val Met Val Glu His Arg Ser Ile Ile Arg Leu Ala Lys

1780

1785

1790

Lys Asn Arg Ile Ile Ser Arg Phe Pro Ser Val Ala Lys Val Ala His

1795

1800

1805

Leu Ser Asn Ile Ala Phe Asp Ala Ala Thr Trp Glu Met Phe Ala Ala

1810

1815

1820

Leu Leu Asn Gly Gly Thr Leu Val Cys Ile Asp Tyr Met Thr Thr Leu

825

1830

1835

1840

Asp Ser Lys Thr Leu Glu Ala Ala Phe Ala Arg Glu Gln Ile Asn Ala

1845

1850

1855

Ala Leu Leu Thr Pro Ala Leu Leu Lys Gln Cys Leu Ala Asn Ile Pro

1860

1865

1870

Thr Thr Leu Gly Arg Leu Ser Ala Leu Val Ile Gly Gly Asp Arg Leu

1875

1880

1885

Asp Gly Gln Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Leu Val Gly Ala Gly Val

1890

1895

1900

Tyr Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Asn Gly Val Ile Ser Thr Ile Tyr

905

1910

1915

1920

Asn Ile Thr Lys Asn Asp Ser Phe Ile Asn Gly Val Pro Ile Gly Cys

1925

1930

1935

Ala Ile Ser Asn Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Asp Pro Asp Gln Gln Leu

1940

1945

1950

Val Pro Pro Gly Val Met Gly Glu Leu Val Val Thr Gly Asp Gly Leu

1955

1960

1965

Ala Arg Gly Tyr Thr Asp Pro Ala Leu Asp Ala Gly Arg Phe Val Gln

1970

1975

1980

Ile Met Ile Asn Asp Lys Ala Val Arg Ala Tyr Arg Thr Gly Asp Arg

985

1990

1995

2000

Ala Arg Tyr Arg Val Gly Asp Gly Gln Ile Glu Phe Phe Gly Arg Met

2005

2010

2015

Asp Gln Gln Val Lys Ile Arg Gly His Arg Ile Glu Pro Ala Glu Val

2020

2025

2030

Glu Arg Ala Ile Leu Asp Gln Asp Ser Ala Arg Asp Ala Val Val Val

2035

2040

2045

Ile Arg His Gln Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Val Gly Phe Val Ala

2050

2055

2060

Thr His Gly Asp His Ser Ala Glu Gln Glu Glu Ala Asp Asp Gln Val

065

2070

2075

2080

Glu Gly Trp Lys Asp Phe Phe Glu Ser Asn Thr Tyr Ala Asp Met Asp

2085

2090

2095

Thr Ile Gly Gln Ser Ala Ile Gly Asn Asp Phe Thr Gly Trp Thr Ser

2100

2105

2110

Met Tyr Asp Gly Ser Glu Ile Asn Lys Ala Glu Met Gln Glu Trp Leu

2115

2120

2125

Asp Asp Thr Met Arg Thr Leu Leu Asp Gly Gln Ala Pro Gly His Val

2130

2135

2140

Leu Glu Ile Gly Thr Gly Ser Gly Met Val Leu Phe Asn Leu Gly Ala

145

2150

2155

2160

Gly Leu Gln Ser Tyr Val Gly Leu Glu Pro Ser Arg Ser Ala Ala Thr

2165

2170

2175

Phe Val Thr Lys Ala Ile Asn Ser Thr Pro Ala Leu Ala Gly Lys Ala

2180

2185

2190

Glu Val His Val Gly Thr Ala Thr Asp Ile Asn Arg Leu Arg Gly Leu

2195

2200

2205

Arg Pro Asp Leu Val Val Leu Asn Ser Val Val Gln Tyr Phe Pro Thr

2210

2215

2220

Pro Glu Tyr Leu Leu Glu Val Val Glu Ser Leu Val Arg Ile Pro Gly

2225

2230

2235

2240

Val Lys Arg Val Val Phe Gly Asp Ile Arg Ser His Ala Thr Asn Arg

2245

2250

2255

His Phe Leu Ala Ala Arg Ala Leu His Ser Leu Gly Ser Lys Ala Thr

2260

2265

2270

Lys Asp Ala Ile Arg Gln Lys Met Thr Glu Met Glu Glu Arg Glu Glu

2275

2280

2285

Glu Leu Leu Val Asp Pro Ala Phe Phe Thr Ala Leu Leu Gln Gly Gln

2290

2295

2300

Leu Ala Asp Arg Ile Lys His Val Glu Ile Leu Pro Lys Asn Met Arg

305

2310

2315

2320

Ala Thr Asn Glu Leu Ser Ala Tyr Arg Tyr Thr Ala Val Ile His Val

2325

2330

2335

Arg Gly Pro Glu Glu Gln Ser Arg Pro Val Tyr Pro Ile Gln Val Asn

2340

2345

2350

Asp Trp Ile Asp Phe Gln Ala Ser Arg Ile Asp Arg Arg Ala Leu Leu

2355

2360

2365

Arg Leu Leu Gln Arg Ser Ala Asp Ala Ala Thr Val Ala Val Ser Asn

2370

2375

2380

Ile Pro Tyr Ser Lys Thr Ile Val Glu Arg His Val Val Glu Ser Leu

385

2390

2395

2400

Asp Asn Asn Asn Arg Glu Asn Thr His Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala

2405

2410

2415

Trp Ile Ser Ala Val Arg Ser Lys Ala Glu Arg Cys Thr Ser Leu Ser

2420

2425

2430

Val Thr Asp Leu Val Gln Leu Gly Glu Glu Ala Gly Phe Arg Val Glu

2435

2440

2445

Val Ser Ala Ala Arg Gln Trp Ser Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Val

2450

2455

2460

Phe His Arg Tyr Asn Leu Pro Thr Gln Ser Asn Ser Arg Val Leu Ile

465

2470

2475

2480

Gln Phe Pro Thr Glu Asp Gly Gln Thr Arg Arg Ser Ala Thr Leu Thr

2485

2490

2495

Asn Arg Pro Leu Gln Arg Leu Gln Ser Arg Arg Phe Ala Ser Gln Ile

2500

2505

2510

Arg Glu Gln Leu Lys Ala Val Leu Pro Ser Tyr Met Ile Pro Ser Arg

2515

2520

2525

Ile Val Val Ile Asp Gln Met Pro Leu Asn Ala Asn Gly Lys Val Asp

2530

2535

2540

Arg Lys Glu Leu Thr Arg Arg Ala Gln Ile Ala Pro Lys Ser Gln Ala

545

2550

2555

2560

Ala Pro Ala Lys Pro Val Lys Gln Val Asp Pro Phe Val Asn Leu Glu

2565

2570

2575

Ala Ile Leu Cys Glu Glu Phe Ala Glu Val Leu Gly Met Glu Val Gly

2580

2585

2590

Val Asn Asp His Phe Phe Gln Leu Gly Gly His Ser Leu Leu Ala Thr

2595

2600

2605

Lys Leu Val Ala Arg Leu Ser Arg Arg Leu Asn Gly Arg Val Ser Val

2610

2615

2620

Arg Asp Val Phe Asp Gln Pro Val Ile Ser Asp Leu Ala Val Thr Leu

625

2630

2635

2640

Arg Gln Gly Leu Thr Leu Glu Asn Ala Ile Pro Ala Thr Pro Asp Ser

2645

2650

2655

Gly Tyr Trp Glu Gln Thr Met Ser Ala Pro Thr Thr Pro Ser Asp Asp

2660

2665

2670

Met Glu Ala Val Leu Cys Lys Glu Phe Ala Asp Val Leu Gly Val Glu

2675

2680

2685

Val Ser Ala Thr Asp Ser Phe Phe Asp Leu Gly Gly His Ser Leu Met

2690

2695

2700

Ala Thr Lys Leu Ala Ala Arg Ile Ser Arg Arg Leu Asp Val Pro Val

705

2710

2715

2720

Ser Ile Lys Asp Ile Phe Asp His Ser Val Pro Leu Asn Leu Ala Arg

2725

2730

2735

Lys Ile Arg Leu Thr Gln Ala Lys Gly His Glu Ala Thr Asn Gly Val

2740

2745

2750

Gln Ile Ala Asn Asp Ala Pro Phe Gln Leu Ile Ser Val Glu Asp Pro

2755

2760

2765

Glu Ile Phe Val Gln Arg Glu Ile Ala Pro Gln Leu Gln Cys Ser Pro

2770

2775

2780

Glu Thr Ile Leu Asp Val Tyr Pro Ala Thr Gln Met Gln Arg Val Phe

785

2790

2795

2800

Leu Leu Asn Pro Val Thr Gly Lys Pro Arg Ser Pro Thr Pro Phe His

2805

2810

2815

Ile Asp Phe Pro Pro Asp Ala Asp Cys Ala Ser Leu Met Arg Ala Cys

2820

2825

2830

Ala Ser Leu Ala Lys His Phe Asp Ile Phe Arg Thr Val Phe Leu Glu

2835

2840

2845

Ala Arg Gly Glu Leu Tyr Gln Val Val Leu Lys His Val Asp Val Pro

2850

2855

2860

Ile Glu Met Leu Gln Thr Glu Glu Asn Ile Asn Ser Ala Thr Arg Ser

865

2870

2875

2880

Phe Leu Asp Val Asp Ala Glu Lys Pro Ile Arg Leu Gly Gln Pro Leu

2885

2890

2895

Ile Arg Ile Ala Ile Leu Glu Lys Pro Gly Ser Thr Leu Arg Val Ile

2900

2905

2910

Leu Arg Leu Ser His Ala Leu Tyr Asp Gly Leu Ser Leu Glu His Ile

2915

2920

2925

Leu His Ser Leu His Ile Leu Phe Phe Gly Gly Ser Leu Pro Pro Pro

2930

2935

2940

Pro Lys Phe Ala Gly Tyr Met Gln His Val Ala Ser Ser Arg Arg Glu

945 2950 2955 2960

Gly Tyr Asp Phe Trp Arg Ser Val Leu Arg Asp Ser Ser Met Thr Val

2965 2970 2975

Ile Lys Gly Asn Asn Asn Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Gln Gln Gln

2980 2985 2990

Ser Thr Pro Ser Gly Ala His His Ala Ser Lys Val Val Thr Ile Pro

2995 3000 3005

Thr Gln Ala Asn Thr Asp Ser Arg Ile Thr Arg Ala Thr Ile Phe Thr

3010 3015 3020

Thr Ala Cys Ala Leu Met Leu Ala Lys Glu Asp Asn Ser Ser Asp Val

025

3030

3035

3040

Val Phe Gly Arg Thr Val Ser Gly Arg Gln Gly Leu Pro Leu Ala His

3045

3050

3055

Gln Asn Val Ile Gly Pro Cys Leu Asn Gln Val Pro Val Arg Ala Arg

3060

3065

3070

Gly Leu Asn Arg Gly Thr Thr His His Arg Glu Leu Leu Arg Glu Met

3075

3080

3085

Gln Glu Gln Tyr Leu Asn Ser Leu Ala Phe Glu Thr Leu Gly Tyr Asp

3090

3095

3100

Glu Ile Lys Ala His Cys Thr Asp Trp Pro Asp Val Pro Ala Thr Ala

105

3110

3115

3120

Ser Phe Gly Cys Cys Ile Val Tyr Gln Asn Phe Asp Ser His Pro Asp

3125

3130

3135

Ser Arg Val Glu Glu Gln Arg Leu Gln Ile Gly Val Leu Ser Arg Asn

3140

3145

3150

Tyr Glu Ala Ile Asn Glu Gly Leu Val His Asp Leu Val Ile Ala Gly

3155

3160

3165

Glu Ser Glu Pro Asp Gly Asp Asp Leu Arg Val Thr Val Val Ala Asn

3170

3175

3180

Arg Arg Leu Cys Asp Glu Glu Arg Leu Lys Arg Met Leu Glu Glu Leu

185

3190

3195

3200

Cys Gly Asn Ile Arg Ala Leu Ala Leu Val

3205

3210

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

tggacnwsna tgtaygaygg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gtnggraart aytgnacnac

20

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

gcggaattaa ccctcactaa agggaacgaa

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

gcgtaatacg actcactata gggcgaagaa

30

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

agcatcggat cctaacaatg ggcgttgagc agcaagccct a

41

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

tttgcttcgt actcgggtcc t

21

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

gcatcgcat actagagaag

20

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 10

agcatcgaat tcggatccct aaaccaacgc caaagcccga at

42

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 11

tgatatgctg gagcttcct

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 12

gcacaacctc tttccaggct

20

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 13

agcatcggat cctaacaatg tcaaacaatgg caccactccc ta

42

【図面の簡単な説明】

【図 1】

第 1 図にプラスミド pABP/PFsyn の作製方法を示す。

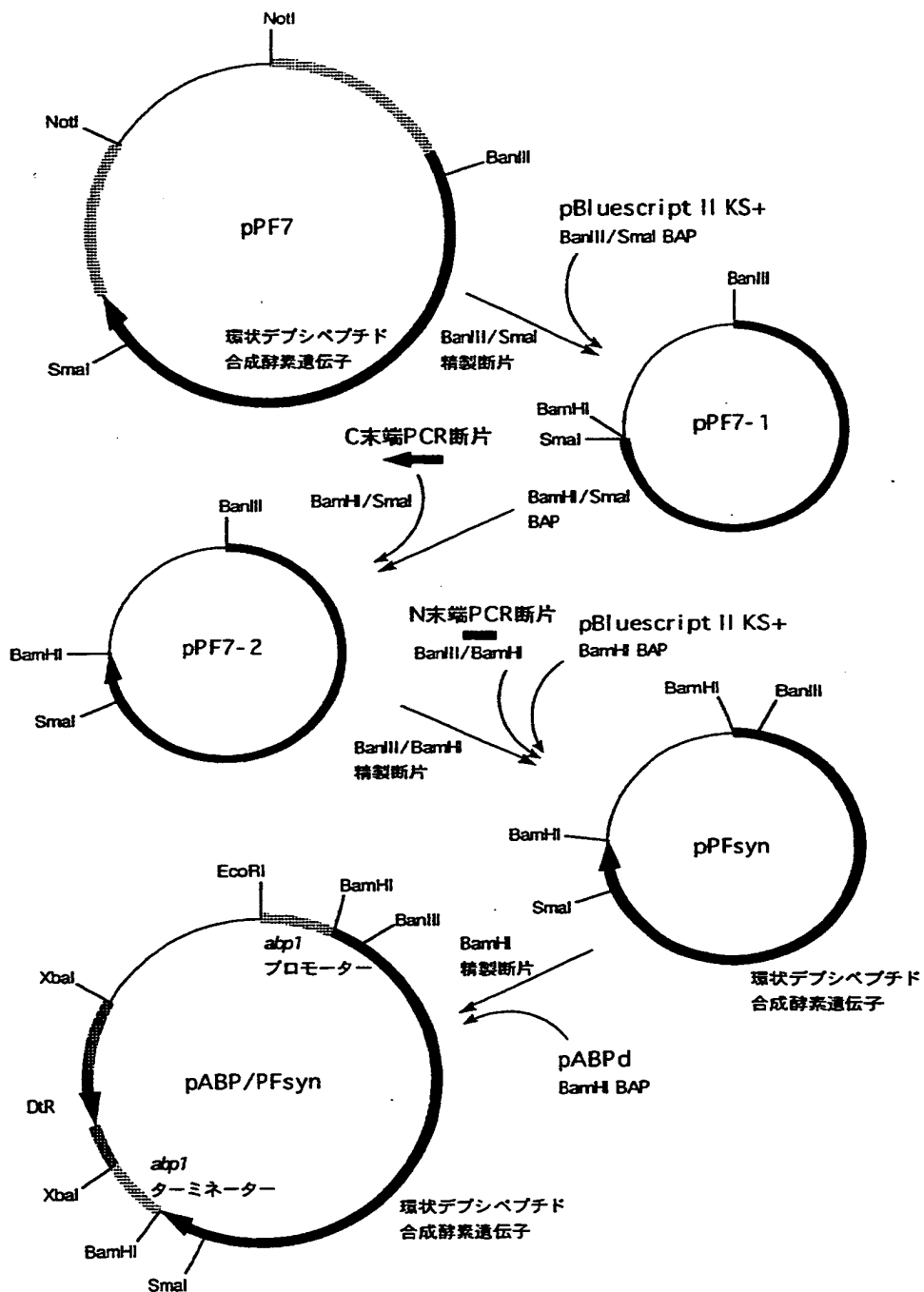
【図 2】

第 2 図に遺伝子導入株における本発明遺伝子翻訳産物である環状デブシペプチド合成酵素の発現について SDS-PAGE で解析した結果を模式的に示す。

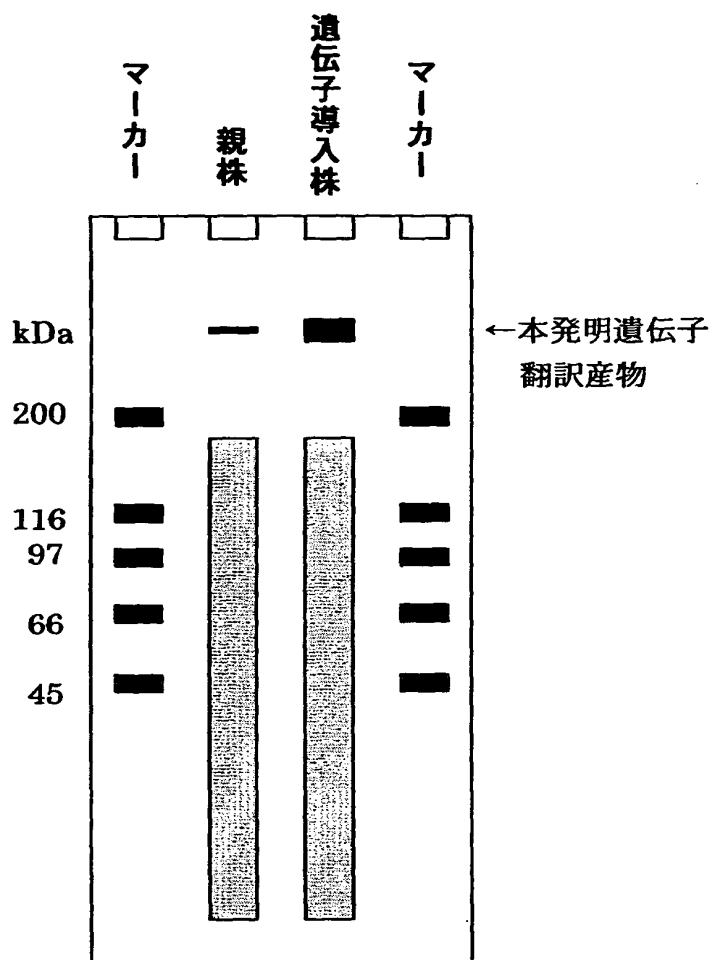
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 駆虫活性を有する環状デプシペプチド、PF1022物質の生産性を向上させることができる環状デプシペプチド合成酵素遺伝子及びこれをコードするタンパク質、並びに該遺伝子を有する組換えベクター、この組換えベクターを導入したPF1022物質生産菌及びPF1022物質の生産方法を提供すること。

【解決手段】

PF1022物質生産菌から、PF1022物質の生合成を触媒する環状デプシペプチド合成酵素をコードする遺伝子を単離した。該遺伝子のプロモーター及びターミネーターを高発現を可能とする別の遺伝子のものに置換した組換えベクターを作製し、PF1022物質生産菌に導入したところ、PF1022物質の生産性の向上が達成された。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006091]

1. 変更年月日	1990年 8月 3日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区京橋2丁目4番16号
氏 名	明治製菓株式会社